

TANAH 10/769017



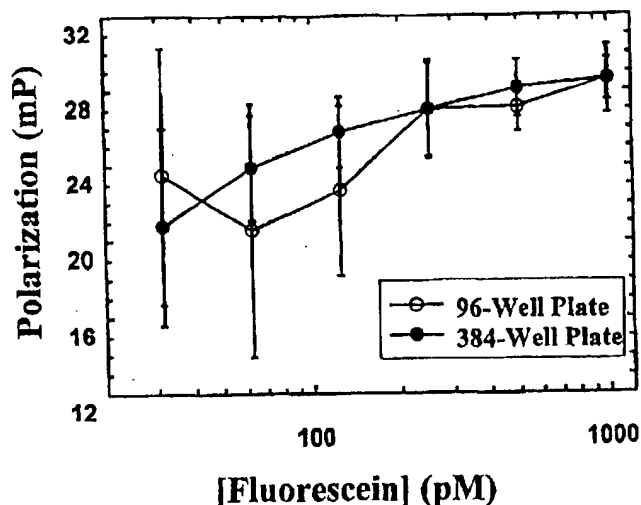
PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 : G01N		A2	(11) International Publication Number: WO 99/23466
			(43) International Publication Date: 14 May 1999 (14.05.99)
(21) International Application Number: PCT/US98/23095		(71) Applicant (for all designated States except US): IJI BIOSYSTEMS, INC. [US/US]; 404 Tasman Drive, Sunnyvale, CA 94089 (US).	
(22) International Filing Date: 30 October 1998 (30.10.98)		(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): MODLIN, Douglas, N. [US/US]; 4063 Scripps Avenue, Palo Alto, CA 94036 (US). QWICKI, John, C. [US/US]; 956 North California Avenue, Palo Alto, CA 94303 (US).	
(30) Priority Data:		(74) Agent: ABNEY, James, R.; Kolisch, Hartwell, Dickinson, McCormack & Heuser, Suite 200, 520 S.W. Yamhill Street, Portland, OR 97204 (US).	
60/063,811 31 October 1997 (31.10.97) US 60/072,499 26 January 1998 (26.01.98) US 60/072,780 27 January 1998 (27.01.98) US 60/075,414 20 February 1998 (20.02.98) US 60/075,806 24 February 1998 (24.02.98) US 09/062,472 17 April 1998 (17.04.98) US 60/082,253 17 April 1998 (17.04.98) US 60/084,167 4 May 1998 (04.05.98) US 60/085,335 13 May 1998 (13.05.98) US 60/085,500 14 May 1998 (14.05.98) US 60/089,848 19 June 1998 (19.06.98) US 60/092,203 9 July 1998 (09.07.98) US 60/094,275 27 July 1998 (27.07.98) US 60/094,276 27 July 1998 (27.07.98) US 09/156,318 18 September 1998 (18.09.98) US 60/100,951 18 September 1998 (18.09.98) US 60/100,817 18 September 1998 (18.09.98) US 09/160,533 24 September 1998 (24.09.98) US 60/104,964 20 October 1998 (20.10.98) US		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
		Published Without international search report and to be republished upon receipt of that report.	

(54) Title: APPARATUS AND METHODS FOR MEASURING FLUORESCENCE POLARIZATION



(57) Abstract

An apparatus for measuring polarized light emitted from a composition that includes a stage configured to hold a microplate having an array of sample wells, a continuous high color temperature light source, and a detector. An excitation optical relay structure directs light from the light source through an excitation polarizer toward a composition in one of the sample wells. An emission optical relay structure directs light emitted from the composition through an emission polarizer toward the detector.

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-521670

(P2003-521670A)

(43) 公表日 平成15年7月15日 (2003.7.15)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テームド* (参考)

G 0 1 N 21/64

G 0 1 N 21/64

A 2 G 0 2 0

B 2 G 0 4 3

G 0 1 J 3/447

G 0 1 J 3/447

2 G 0 5 9

G 0 1 N 21/21

G 0 1 N 21/21

Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁)

(21) 出願番号 特願2000-519281(P2000-519281)

(86) (22) 出願日 平成10年10月30日 (1998.10.30)

(85) 翻訳文提出日 平成12年5月1日 (2000.5.1)

(86) 国際出願番号 PCT/US 98/23095

(87) 国際公開番号 WO 99/023466

(87) 国際公開日 平成11年5月14日 (1999.5.14)

(31) 優先権主張番号 60/063, 811

(32) 優先日 平成9年10月31日 (1997.10.31)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 60/072, 499

(32) 優先日 平成10年1月26日 (1998.1.26)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 エルジェイエル・バイオシステムズ・イン
コーポレーテッド

アメリカ合衆国・カリフォルニア・

94089・サニーヴェール・タスマン・ドラ

イブ・404

(72) 発明者 ダグラス・エヌ・モドリン

アメリカ合衆国・カリフォルニア・

94036・パロ・アルト・スクリプス・アベ

ニュー・4063

(74) 代理人 弁理士 志賀 正武 (外7名)

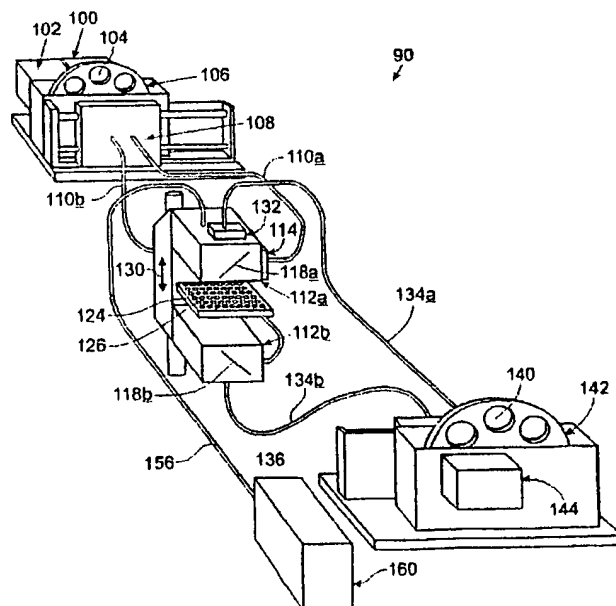
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光偏光を測定する装置及びその方法

(57) 【要約】

【課題】 組成物から発せられた偏光を測定するための高感度で高スループットの装置及びその方法を提供することである。

【解決手段】 試料井戸の列を有するマイクロプレートを支持するために配置されたステージと、連続スペクトル高色温度光源と、励起偏光子を有する励起光学中継構造体と、検出器と、放射偏光子を有する放射光学中継構造体とを備え、前記励起光学中継構造体が前記励起偏光子を介して光源からの光を少なくとも一つの試料井戸に収容された組成物の方へ方向付け、前記放射光学中継構造体が前記放射偏光子を介して組成物から放射された光を検出器の方へ方向付けることを特徴とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 組成物から放射された光の偏光を測定する装置であって、
試料井戸の列を有するマイクロプレートを支持するように構成されたステージ
と；

連続スペクトル高色温度光源と；

励起偏光子を有する励起光学中継構造体と；

検出器と；

放射偏光子を有する放射光学中継構造体とを備え、

前記励起光学中継構造体が前記励起偏光子を介して光源からの光を少なくとも
一つの試料井戸に収容された組成物の方へ方向付け、

前記放射光学中継構造体が前記放射偏光子を介して前記組成物から放射された
光を前記検出器の方へ方向付ける偏光測定装置。

【請求項2】 前記連続スペクトル高色温度光源が少なくとも約3500ケル
ビンの色温度を有する請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項3】 前記連続スペクトル高色温度光源がキセノンアークランプ
である請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項4】 さらに少なくとも光源の一部を囲繞するハウジングを備え
た請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項5】 ルミネセンス偏光分析と、付加分析としてルミネセンス強
度、化学ルミネセンス、フォトルミネセンス寿命、吸収、ルミネセンス共鳴エネ
ルギー移動、及びルミネセンスイメージングのうちの少なくとも一つとを実施す
るよう構成されている請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項6】 前記励起偏光子と前記放射偏光子とが前記の付加分析にお
いて固定種からのバックグラウンドを低減するように交差している請求項5に記載
の偏光測定装置。

【請求項7】 前記放射光学中継構造体によって検出器に向けられた光が
、組成物の近傍で、前記励起光学中継構造体によって組成物に向けられた光に対
して反平行に進む請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項8】 実質的に組成物の感知ボリュームだけを透過した光を検出

することができる請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項9】 組成物が境界界面間に形成されている空間に收容され、感知ボリュームが前記境界界面の少なくとも一つから実質的に離開している請求項8に記載の偏光測定装置。

【請求項10】 第2の光源を備え、高色温度光源が定常状態偏光分析用に形成されており、かつ前記第2の光源が時間分解偏光分析用に形成されている請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項11】 前記放射光学中継構造体と前記励起光学中継構造体とがそれぞれファイバー光学ケーブルを含んでいる請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項12】 前記放射光学中継構造体と前記励起光学中継構造体とが二色ビームスプリッターを共有する請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項13】 前記二色ビームスプリッターが蛍光信号の透過を増加するため、及びバックグラウンドノイズの透過を低減するために、予め選択されたカットオフ波長を有する請求項12に記載の偏光測定装置。

【請求項14】 光源で生成された光の強度を変えことなく、組成物に入射する光の強度を変えるように構成された変調機構部をさらに備えた請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項15】 前記放射光学中継構造体と前記励起光学中継構造体とが多色ビームスプリッターを共有する請求項1に記載の偏光測定装置。

【請求項16】 組成物から放射された光の偏光を測定する装置であって

検査サイトで組成物を支持するステージと；

組成物の連続分析のために、連続組成物と検査サイトとを自動的にレジスターに運ぶ自動位置合わせ装置と；

連続スペクトル高色温度光源と；

励起偏光子を有する励起光学中継構造体と；

検出器と；

放射偏光子を有する放射光学中継構造体とを備え、

前記励起光学中継構造体が前記励起偏光子を介して光源からの光を組成物の方

へ方向付け、

前記放射光学中継構造体が前記放射偏光子を介して組成物から放射された光を検出器の方へ方向付ける偏光測定装置。

【請求項17】 組成物から放射された光の偏光を測定する装置であって

検査サイトで組成物を支持するステージと；

連続スペクトル光源と；

時間変動光源と；

励起偏光子を有する励起光学中継構造体と；

前記連続スペクトル光源かあるいは前記時間変動光源かのいずれかを交換可能に前記光学中継構造体に接続するように構成された交換機構部と；

検出器と；

放射偏光子を有する放射光学中継構造体とを備え、

前記励起光学中継構造体が前記励起偏光子を介して光を組成物の方へ方向付け

前記放射光学中継構造体が放射偏光子を介して組成物から放射された光を検出器の方へ方向付ける偏光測定装置。

【請求項18】 前記連続スペクトル光源が定常状態偏光測定に対して使用され、かつ前記時間変動光源が時間分解偏光測定に対して使用される請求項17に記載の偏光測定装置。

【請求項19】 前記連続スペクトル光源は連続スペクトル高色温度光源である請求項17に記載の偏光測定装置。

【請求項20】 前記連続スペクトル光源が、高色温度光源、レーザー、及び発光ダイオードから成るグループから選択される請求項17に記載の偏光測定装置。

【請求項21】 組成物から放射された光の偏光を測定する装置であって

試料井戸の列を有するマイクロプレートを支持するように形成されたステージと；

光源と；

励起偏光子を有する励起光学中継構造体と；

検出器と；

放射偏光子を有する放射光学中継構造体とを備え、

前記励起光学中継構造体が前記励起偏光子を介して光を前記試料井戸の少なくとも一つに収容された組成物の方へ方向付け、

前記放射光学中継構造体が放射偏光子を介して組成物から放射された光を検出器の方へ方向付け、

pH7.5の100ピコモルのフルオレセイン溶液から前記検出器で収集された光子数が100ミリ秒で10,000個を越えるように、前記光源と前記検出器と前記励起及び放射光学中継構造体とが選択された偏光測定装置。

【請求項22】 前記光源が高色温度光源、レーザー、及び発光ダイオードから成るグループから選択された請求項21に記載の偏光測定装置。

【請求項23】 前記光源が連続スペクトル高色温度光源である請求項22に記載の偏光測定装置。

【請求項24】 前記放射光学中継構造体によって検出器に向けられた光が、組成物の近傍で、前記励起光学中継構造体によって組成物に向けられた光に対して反平行に進む請求項21に記載の偏光測定装置。

【請求項25】 前記放射光学中継構造体と前記励起光学中継構造体とが二色ビームスプリッターを共有する請求項24に記載の偏光測定装置。

【請求項26】 前記二色ビームスプリッターが蛍光信号の透過を増加するため、及びバックグラウンドノイズの透過を低減するために、予め選択されたカットオフ波長を有する請求項24に記載の偏光測定装置。

【請求項27】 前記放射光学中継構造体と前記励起光学中継構造体とが多色ビームスプリッターを共有する請求項24に記載の偏光測定装置。

【請求項28】 フルオレセイン溶液が500マイクロリットル以下の体積を有する請求項21に記載の偏光測定装置。

【請求項29】 フルオレセイン溶液が10ミリリットル以下の体積を有する請求項21に記載の偏光測定装置。

【請求項30】 光源が組成物において2ミリメートル以下の最小直径を有する断面積を有する請求項21に記載の偏光測定装置。

【請求項31】 組成物から放射された光の偏光を測定する装置であって

検査サイトで組成物を支持するステージと；

光源と；

励起偏光子を介して前記光源からの光を組成物へ方向付ける励起光学中継構造体と；

前記組成物から放射された光を検出する検出器と；

放射偏光子を介して組成物から放射された光を検出器の方へ方向付ける放射光学中継構造体と；

pH7.5の100ピコモルのフルオレセイン溶液から前記検出器で収集された光子数が100ミリ秒で10,000個を越えるように、光を生成し、方向付け、検出する手段とを備えた偏光測定装置。

【請求項32】 組成物から放射された光の偏光を測定する装置であって

試料井戸の列を有するマイクロプレートを支持するように形成されたステージと；

光源と；

励起偏光子を有する励起光学中継構造体と；

検出器と；

放射偏光子を有する放射光学中継構造体とを備え、

前記励起光学中継構造体が前記励起偏光子を介して光を前記試料井戸の少なくとも一つに収容された組成物の方へ方向付け、

前記放射光学中継構造体が放射偏光子を介して組成物から放射された光を検出器の方へ方向付け、

光子ノイズが試料井戸の一つにおいてpH7.5の100ピコモルのフルオレセイン溶液から放射された光信号の1%以下であるように、前記光源が390nmから770nmの範囲の光を十分放射する偏光測定装置。

【請求項33】 前記光源が390nmから770nmの範囲にわたって少なくとも1ワットのパワーを有する請求項32に記載の偏光測定装置。

【請求項34】 前記光源がレーザーである請求項32に記載の偏光測定装置。

【請求項35】 前記光源が390nmから770nmの連続範囲にわたって多色光を発する請求項32に記載の偏光測定装置。

【請求項36】 前記光源が連続スペクトルキセノンアークランプである請求項32に記載の偏光測定装置。

【請求項37】 前記光源が390nmから770nmの範囲にわたって少なくとも5ワットのパワーを有する請求項32に記載の偏光測定装置。

【請求項38】 組成物から放射された光の偏光を測定する装置であって

試料井戸の列を有するマイクロプレートを支持するように形成されたステージと；

390nmから770nmの波長範囲にわたって少なくとも1ワットのパワーを有する光源と；

励起偏光子を有する励起光学中継構造体と；

検出器と；

放射偏光子を有する放射光学中継構造体とを備え、

前記励起光学中継構造体が前記励起偏光子を介して光を前記試料井戸の少なくとも一つに収容された組成物の方へ方向付け、

前記放射光学中継構造体が放射偏光子を介して組成物から放射された光を検出器の方へ方向付ける偏光測定装置。

【請求項39】 前記光源がレーザーである請求項38に記載の偏光測定装置。

【請求項40】 前記光源が390nmから770nmの連続範囲にわたって多色光を発する請求項38に記載の偏光測定装置。

【請求項41】 前記光源が連続スペクトルキセノンアークランプである請求項38に記載の偏光測定装置。

【請求項 4 2】 pH7.5の100ピコモル溶液から前記検出器で収集された光子数が100ミリ秒で10,000個を越えるように、前記励起光学中継構造体が前記光源からの光を十分透過する請求項 3 8に記載の偏光測定装置。

【請求項 4 3】 前記フルオロセイン溶液が500マイクロリットル以下の体積を有する請求項 4 2に記載の偏光測定装置。

【請求項 4 4】 前記フルオロセイン溶液が10マイクロリットル以下の体積を有する請求項 4 2に記載の偏光測定装置。

【請求項 4 5】 組成物から放射された光の偏光を測定する方法であって

連続試料が検査サイトを横切る光学経路に自動的に直列に配置するように、光色温度光を一定に偏光し検査サイトへ透過させ、

各試料から放射された偏光光を検出することを備えた偏光測定方法。

【請求項 4 6】 さらにマイクロプレートに試料を配置することを備えた請求項 4 5に記載の偏光測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は光ルミネセンスに関するものである。さらに詳細には、本発明はエンハンスされた感度を用いて光ルミネセンス偏光を測定する装置及びその方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

蛍光スペクトル分析は、分子系の成分及び特性を特徴付ける蛍光を利用する；例えば、蛍光分析は、候補の薬剤化合物を識別するために、高処理量選別処理において使用してもよい。蛍光スペクトル分析を蛍光偏光（FP）、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、蛍光寿命（FLT）、全内部反射（TIR）蛍光、蛍光関連スペクトロスコピー（FCS）、及び蛍光退色回復（FRAP）を基礎にしている。それらはそれぞれ利点と欠点を有する。例えば、蛍光偏光分析は均一的でかつ比率的であるが、そのため、濃度、体積、あるいはメニスカス形状において試料間での変動に対して比較的反応しない。

【0003】

蛍光偏光分析は、偏光した光の吸収及び放射を含んでいる（偏光は、一般的に光の伝播方向に垂直な光の電場の方向を指している）。蛍光偏光分析では、蛍光偏光試料は偏光した励起光によって照射される。ここで、励起光は、その偏光方向を指向する吸収双極子を有する蛍光体を選択的に励起する。これらの分子は、その放射双極子に平行に偏光した光を選択的に放射することによってその後崩壊する。放射光が偏光するトータルの量は、励起状態の寿命間の分子の再配向（再配向分子のサイズ、形状、及び環境）の程度に依存する。従って、蛍光偏光分析はそれらの応用間の結合反応及び酵素の活動の量を測定するために使用してもよい。

【0004】

蛍光偏光分析は、様々な光源を用いて実施されてきた。学術研究機関の場合、蛍光偏光分析用の光源にはレーザー及びアークランプ（例えば、キセノンアーク

ランプ)を含んでいる。不幸にして、これらの光源には多くの欠点を有する。キセノンアークランプにおける気体は高圧下(約10気圧)にあり、そのため、爆発の危険がつきまといっている。レーザー及びキセノンアークランプに対する電源は、非常に高い電流(約25アンペア)及び電圧(約20,000ボルトから40,000ボルト)で作動する。そのため、感電死及び他の健康障害の危険がつきまといっている。特に、キセノンアークランプに対する電源はオゾンを発生し、ランプがついたときに致命的なショックを与えるかもしれない。電源は、システムの他の電子的要素に損傷を与える過度電流(transient)を生成するかもしれない。レーザー及びキセノンアークランプから放射された光は非常に強度が高いため、目へのダメージがいつもつきまといっている。特に、極端な明度は網膜にダメージを与えるかもしれない。また、キセノンアークランプ及びいくつかのレーザーによって放射された紫外光は角膜にダメージを与えるかもしれない。レーザー及びいくつかのアークランプ(例えば、水銀)のスペクトル出力は非常に限定されており、そのため、所望の励起波長は手に入らないかもしれない。アークランプの寿命は非常に短いかもしれない(典型的には約300時間)ので、ランプは頻繁に交換しなければならない。それによって、運転者をランプ及び電源に起因した危険にさらすことになる。

【 0 0 0 5 】

これらの欠点は、研究所以外でも益々重要性が高まることが予想される。例えば、高処理能力遮断(high-throughput screening)の応用においては、光源はほぼ連続的に使用されるかもしれない。そのため、レーザー及びアークランプに起因する危険は拭えない。光源は、安全問題に不慣れなあるいは無関心な比較的未熟な運転者にも使用されるかもしれない。

【 0 0 0 6 】

高処理能力スクリーニング実験においては、蛍光偏光分析の光源は白熱(例えば、タングステン)灯及びフラッシュランプを含む。白熱灯は比較的一般的でかつ安価であり、オーバーヘッドプロジェクターのランプを含む。白熱灯は幅広いスペクトルの光を発し、そのため、様々な蛍光化合物を用いて使用してもよい。フラッシュランプはもっと風変わりであり、白熱灯を越えるいくつかの利点があ

る。特に、フラッシュランプは時間分解及び定常状態測定用に使用してもよい。この融通性によって、定常状態及び時間分解蛍光偏光分析のような多重分析を行う装置において同じ光源を使用できるようになっている。さらに、フラッシュランプは10,000時間もの超寿命を有する。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、組成物から発せられた偏光を測定するための高感度で高スループットの装置及びその方法を提供する。装置は、マイクロプレートのような容器を支持するステージを使用する。光源は、励起偏光子 (excitation polarizer) を介して検査位置にある容器内の組成物に光を向ける励起光学中継構造物に接続している。光学中継構造物は、放射偏光子を介して組成物から発せられた光を伝送し、偏光光を検出器へ向ける。装置の構成要素は、フォトンノイズが検査位置の小密度の蛍光体から発せられた光強度に比較して最小になるように選択されかつ構成されている。

【 0 0 0 8 】

好適な実施形態では、光源はキセノンアークランプのような連続高色温度ランプである。光源はレーザーあるいは発光ダイオードであってもよい。

【 0 0 0 9 】

装置の機能的要素は、高温度ランプに関連した潜在的危険を最小にするように構成された一あるいは二以上の固いハウジングに収容されている。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

本発明の本質は、図面と以下の好適な実施形態の詳細な記載を考察することによってさらに深く理解されるだろう。

【 0 0 1 1 】

本発明は、組成物から発せられた偏光を測定する装置及びその方法を提供する。一般的に、その装置及び方法は、光源と、検出器と、光源と組成物と検出器とを間に光を向ける（励起及び発光偏光子を有する）励起及び発光光学中継構造物とを使用する。理解を容易にするために、以下の本発明の記載は6つのパートに

分割する：（１）偏光の説明、（２）偏光装置の説明、（３）偏光の測定方法、（４）信号のエンハンスメント、（５）好適な光源の説明、（６）偏光実験の説明。

【 0 0 1 2 】

偏光の概要

図１は、蛍光偏光が分子の再配向にどのように影響されるかを示す概略図である。蛍光偏光分析においては、組成物３２内の特定の分子３０は一あるいは二以上の蛍光体を使ってラベルする。励起光の偏光に平行に並んだ吸収双極子を有する蛍光体（黒で図示）を選択的に励起する組成物は偏光励起光を使って照明する。励起蛍光体は、その後発光双極子に平行に偏光した選択的に発光する光によって減衰する。

【 0 0 1 3 】

発光が偏光する全割合は、蛍光寿命 τ_f で示す蛍光の励起と発光との間のインターバル時間の間の分子の再配向の度合いに依存する。そして、分子の再配向の度合いは、再配向する分子の寿命及びサイズ、形状、環境に依存する。特に、分子は、サイズに比例する回転相関時間 τ_{rot} を使った拡散を介して回転する。そして、蛍光時間の間、比較的大きな分子はそれほど再回転はしない。そのため、全蛍光は比較的偏光する。対照的に、同じ時間インターバルの間、比較的小さな分子はかなり再回転し、そのため、全蛍光は比較的偏光しない。

【 0 0 1 4 】

偏光と強度の関係は以下の式で表される：

【数１】

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (1)$$

ここで、Pは偏光、 I_{\parallel} は励起光の偏光に平行に偏光した蛍光の強度、 I_{\perp} は励起光の偏光に垂直に偏光した蛍光の強度である。励起と発光との間でほとんど回

転がないならば、 I_{\parallel} は比較的大きく、 I_{\perp} は比較的小さく、 P は1に近い（回転がなければ、 P は1より小さくてもよい；例えば、吸収及び発光双極子が平行でないならば、 P は1より小さい）。対照的に、吸収と発光との間にかんがりの回転があれば、 I_{\parallel} は I_{\perp} に匹敵し、 P は0に近い。 P は0と1との間の値なので、偏光はしばしば0と1との間の値であるミリP単位（ $1000 \times P$ ）で示される。

【 0 0 1 5 】

偏光と回転の関係はペリン（Perrin）方程式によって表される：

【 数 2 】

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \left(1 + \frac{\tau_F}{\tau_{rot}} \right) \quad (2)$$

ここで、 P_0 は分子運動がないときの偏光（固有偏光）、 τ_F は上記の蛍光寿命（崩壊率の逆数）、 τ_{rot} は上記の回転相関時間（回転率の逆数）。

【 0 0 1 6 】

ペリン方程式は、蛍光寿命と回転相関時間とが近いときに偏光分析が最も感度がよいことを示している。回転相関時間は、（球状分子に対する）分子量の各2,400ダルトンの増加に対して約1ナノ秒だけ増加するように分子量に比例する。フルオレセイン（fluorescein）のようなおよそ4ナノ秒の蛍光寿命を有する短め寿命の蛍光体に対して、蛍光偏光分析は約40,000ダルトン以下の分子量に対して非常に感度が高い。Ru(bpy)₃dc bpy（ruthenium 2,2'-dibipyridyl 4,4'-dicarboxyl-2,2'-bipyridine）のようなおよそ400ナノ秒の寿命を有する長めの寿命の蛍光体に対して、蛍光偏光分析は約70,000ダルトンから4,000,000ダルトンの間の分子量に対して非常に感度が高い。

【 0 0 1 7 】

偏光装置の説明

図2は、蛍光偏光を測定する装置50の概略図である。装置50は、光源52と、励起偏光子54と、発光偏光子56と、検出器58とを備えている。光源5

2が発生する光60は、(垂直矢印で示した)偏光励起光が通過する励起偏光子54を介して方向づけられている。偏光励起光は、応答で蛍光放射光64を生成する蛍光試料62上に方向付けられている。蛍光放射光64は、励起光60の偏光に対して垂直(\perp ; 平行矢印で示している)あるいは平行(\parallel ; 垂直矢印で示している)に方向付けられた成分を有する発光偏光子56を介して方向付けられている。その方向に依存して、発光偏光子56は、検出器58によって検出用の放射光64の平行成分(\parallel)あるいは垂直成分(\perp)を通過させる。

【0018】

図3から図6は、蛍光偏光を測定する代替の装置90の概略構成図である。装置90は、光を組成物に運ぶ一あるいは二以上の光源と、前記組成物から送られた光を受光する一あるいは二以上の検出器と、前記光源、前記組成物、及び検出器との間で光を中継する光学中継構造物とを備えている。装置90は、様々な蛍光及び吸光度分析に対して使用してもよい。

【0019】

ここで構成したように、装置90は、連続光源100と時間変調光源102とを備えている。装置90は、4個の光源に対する光源スロット103a-dを備えているが、光源及び光スロットの数は他の数でもよい。光源スロット103a-dは、各光源の少なくとも一部を囲繞してもよいハウジングとして機能しており、照射及び爆発からの保護を提供する。フォトルミネセンス光学システムを介した光伝達の方法を矢印で示す。

【0020】

連続スペクトル光源100は、フォトルミネセンス強度及び定常状態フォトルミネセンス偏光分析のための光を供給する。連続光源100は、アークランプ、レーザー、発光ダイオード及び他の手段を含んでもよい。好適な連続スペクトル光源は、ILC Technology, Inc.製のModel LX175F CERMAXキセノンランプのような高強度、高色温度キセノンアークランプである。色温度は、黒体放射体が光源の色度に等しい色度を有するよう動作しなければならない、ケルビン単位の絶対温度である。高色温度ランプは低色温度ランプより強度の強い光を生成し、また、多くの蛍光体が吸収する可視波長側及び紫外線波長側にヘシフトした最

大の出力を有してもよい。好適な連続スペクトル光源は、タングステンフィラメント源の約3000ケルビンの色温度を大きく越える、5600ケルビンの色温度を有する。好適な連続スペクトル光源は、フラッシュ光源より単位時間あたりの強度がより高い光を提供し、感度を向上し、読み取り時間を低減する。装置90は、光源に生成された光の強度を変えことなく、組成物上に入射する光の強度を変えるように構成された変調機構を含んでもよい。

【 0 0 2 1 】

時間変調光源102は、フォトルミネセンス寿命及び時間分解フォトルミネセンス偏光分析のような時間分解フォトルミネセンス分析用の光を提供する。好適な時間変調光源は、EG&G Electro-Optics製のModel FX-1160キセノンフラッシュランプのようなキセノンフラッシュランプである。好適な光源は、信号検出の前の短いインターバルにの間に光の“フラッシュ”を発生し、時間分域測定に対して特に適している。他の時間変調光源は、外部からポッケルスセル、カーセルあるいは他の機構を使用して強度が変調可能な連続スペクトル光源の他に、パルスレーザーを含んでいる。後者の光源は特に周波数分域測定に適している。

【 0 0 2 2 】

装置90において、連続スペクトル光源100と時間変調光源102は、多色でかつ非偏光でかつ非干渉性の光を生成する。連続スペクトル光源100は実質的に連続な照明を生成し、時間変調光源102が時間変調照明を生成する。これらの光源から光は変更なしで試料に照射されてもよいし、あるいは、強度、スペクトル、偏光、あるいは他の特性を偏光するようにフィルターをかけられてもよい。

【 0 0 2 3 】

光源で生成された光は、テスト位置への励起光学距離に沿って進む。このような光は、試料に運ばれる光のスペクトルを変えるための何らかの機構を一般に備えた一あるいは二以上の“スペクトルフィルター”を通り抜けていく。スペクトルは光の波長成分を示している。白あるいは多くの色を含む多色光を、赤、青、緑、あるいは一あるいは数色だけの光を含む他の実質的単色光に変換するために、スペクトルフィルターを使用してもよい。装置90においては、スペクトルは

、予め選択された波長の光を選択的に伝達しかつ他の波長の光を選択的に吸収する励起干渉フィルター104によって変えられる。便宜上、励起干渉フィルター104は、励起光のスペクトルを予め選択されたフィルターを光学経路 (optical path) へと回転することによって変えることが可能な励起干渉ホイール106上に收容してもよい。スペクトルフィルターは、波長によって光を空間的に分解してもよい。スペクトルフィルターには、例えば、格子、モノクロメータ、及びプリズムがある。

【 0 0 2 4 】

スペクトルフィルターには、単一の波長の光のみを発するレーザーのような単色 (“一色”) 光源を要求しない。従って、励起フィルターホイール106は、いくつかの光源スリット103a、103bの光学経路上に載置し、他の光源スリット103c、103dの光学経路上に載置しないようにしてもよい。

【 0 0 2 5 】

次に、光を頂上光学ヘッドあるいは底部光学ヘッド112a、112bのそれぞれに供給するために、適当な光源の前に励起ファイバー光学ケーブル110a、110bを位置づける励起光学シャトル (あるいはスイッチ) を光は通過する。光学ヘッドは、光を感知されるボリュームへ運ぶため、及び感知されるボリュームから伝達した光を受光するために、様々な光学部材を含んでいる。光は、水が庭用のホースを伝送するように、ファイバー光学ケーブルを伝送する。ファイバー光学ケーブルは、装置のコーナーの回りを光が容易に回り、装置の不透明部材の回りを光が伝送するように使用することができる。さらに、ファイバー光学ケーブルは光により均一な強度プロファイルを与える。好適なファイバー光学ケーブルは、低自己蛍光を有する融解されたシリコンの束である。これらの利点にもかかわらず、光は、ミラーのような他の機構を使用して光学ヘッドに運ぶこともできる。

【 0 0 2 6 】

光学ヘッドに達した光は、光の偏光を変えるための何らかの機構を備えた一あるいは二以上の励起 “偏光ファイバー” を通過してもよい。励起偏光フィルターは、頂部及び／又は底部光学ヘッドを含んでいてよい。装置90では、偏光は、

頂部光学ヘッド112だけを含む励起偏光子によって変えられる。励起偏光フィルター114は、s偏光光だけが通過するs偏光子Sとp偏光光だけが通過するp偏光子Pと実質的に全ての光が通過するブランクOとを含んでいてもよい。励起偏光子114は、システムのスイッチングを行う標準あるいは強誘電体液晶ディスプレイ(LCD)を含んでいてもよい。このようなシステムは、機械的なスイッチャより迅速で経済的である。励起偏光子114は、偏光分析における信号-ノイズ比を増大する同期検出器を有する連続モードLCD偏光回転子を含んでいてもよい。

【0027】

一方あるいは両方の光学ヘッドにおける光は、光を“感知ボリューム”に焦点を合わせるための何らかの機構を一般に含む励起“共焦光学要素”を通過してもよい。装置90においては、共焦光学要素は、図5に示したように、一組のレンズ117a-cと感知ボリュームに共役した像面に配置した励起アパーチャ116とを含んでいる。アパーチャ116はアパーチャとして直接組み込んでもよいし、あるいはファイバー光学ケーブルの端部のように間接的に組み込んでもよい。レンズ117a、bは試料上にアパーチャ116の像を投影し、そのため、試料の予め選択したボリュームあるいは感知ボリュームだけを照明する。

【0028】

光学ヘッドを通して伝播する光は、反射光を組成物120へ、かつ透過光を光モニター122へ進ませるビームスプリッター118を介して反射されかつ透過される。反射光及び透過光は共に、ビームスプリッター118と組成物120との間に機能的に作用するように配置されたレンズ117bを通過する。

【0029】

ビームスプリッターを使用して、試料及び光モニターに励起光を向け、かつ検出器に放射光を向ける。ビームスプリッターは変更可能であり、そのため、ビームスプリッターは異なる分析モードあるいは組成物に対して最適化されてもよい。多くの数のあるいは様々な蛍光分子はが研究されれば、ビームスプリッターは多くの波長の光に適応されなければならない；この場合には、波長に依存しない入射光の半分を反射し、かつ半分を透過する“50:50”ビームスプリッター

が最適である。このようなビームスプリッターは多くの種類の分子と共に使用可能であるが、まだかなりの励起光を組成物上に運び、かなりの放射光を検出器に透過させる。一あるいは数個の関連蛍光分子を研究すれば、ビームスプリッターは限られた数の波長の光を適用することができる必要がある；この場合には、“二色性”あるいは“多色性”のビームスプリッターが最適である。このようなビームスプリッターは、適当なセットの分子に対するカットオフ波長を備えることも可能であり、励起光及び背景光のほとんどあるいは実質的に全てを反射し、一方、放射光のほとんどあるいは実質的に全てを透過する。これは、ビームスプリッターの反射性及び透過性が波長と共に変えられるから可能となる。

【 0 0 3 0 】

光モニターは、光源で生成された光の強度における揺らぎを補正するのに使用する；このような補正は、検出器で測定された蛍光強度の対応倍と光モニターで測定された励起光強度との比として検出強度を報告することによって実施される。光モニターは、光源が弱くなれば、ユーザーに警告するようにプログラムされていてよい。好適な光モニターは低自己蛍光に対する石英窓を有するシリコン光ダイオードである。

【 0 0 3 1 】

組成物（試料）は、ステージ 1 2 3 に支持された試料ホルダーに固定されている。組成物は、化合物、混合物、表面、溶液、乳濁液、懸濁液、細胞培養、発酵培養、細胞、組織、及び／又は誘導体、及び／又は抽出物である。組成物の分析は、このような組成物におけるフォトルミネセンス分析物の存在、濃度、あるいは（相互作用を含む）物理的性質を測定することを含んでいる。試料ホルダーは、マイクロプレート、バイオチップ、あるいは周知の形の試料の配列を含むことができる。装置 9 0 においては、好適な試料ホルダーは、組成物を固定する複数のマイクロプレート井戸 1 2 6 を含むマイクロプレートである。組成物は、分析に依存する単一のマイクロプレート井戸あるいは複数のマイクロプレート井戸の内容物であってもよい。

【 0 0 3 2 】

感知ボリュームは、典型的には約 25° のテーパ角と、0.1mm と 2.0mm との間の範

囲の最小の直径とを有する砂時計形を有する。96井戸及び384井戸のマイクロプレートに対して、好適な最小直径は約1.5mmである。1536井戸マイクロプレートに対しては、好適な最小直径は約1.0mmである。試料容器のサイズ及び形状は感知ボリュームのサイズと形状とにマッチしていてもよい。

【 0 0 3 3 】

感知ボリュームの位置は、信号－ノイズ比及び信号－バックグラウンド比とを最適化するように、組成物内で精確に移動可能である。例えば、感知ボリュームは、信号－ノイズ比及び信号－バックグラウンド比とを最適化するように、感知ボリュームを試料ホルダー内の壁から移動して、壁に結合し固定した蛍光体に起因した擬信号を低減することが可能である。装置90では、光学経路に垂直なXY面における位置を組成物を支持するステージを移動することによって制御し、一方、光学経路に平行なZ軸に沿った位置は、図3及び図4で示したようなZ軸調整機構を用いて光学ヘッドを移動することによって制御する。しかしながら、感知ボリュームを組成物の適当な一部を有するレジスターあるいは位置合わせ (alignment) に持ってくる機構を備えていてもよい。

【 0 0 3 4 】

頂部及び底部光学の組み合わせによって、分析について：(1) 頂部照明及び頂部検出、あるいは(2) 頂部照明及び底部検出、あるいは(3) 底部照明及び頂部検出、あるいは(2) 底部照明及び底部検出の組み合わせが可能になる。同じ側の照明及び検出の(1)及び(4)は“エピ(epi)”と呼ばれ、フォトルミネセンス分析に好適である。反対側照明及び検出(2)及び(3)は“トランス(trans)”と呼ばれ、吸収分析に好適である。装置90においては、エピモードが使用され、そのため、反対方向あるいは反平行方向であろうとも、励起光及び放射光が光学ヘッドにおいて同じ経路を伝播する。しかしながら、トランスモードが使用されれば、吸収分析にとっては本質的であろう。一般的に、頂部光学は開放頂部を有する同じホルダーを使って使用可能であり、一方、底部光学は、ガラスあるいは薄いプラスチック底部のような光学的に透明な底部を有する同じホルダーを使って使用可能である。

【 0 0 3 5 】

光は組成物によって多重方向に透過する。透明光の一部は放射経路を伝播して検出器へ入る。透過光はレンズ107cを通過し、放射アパーチャー131及び／又は放射偏光子132を通ってもよい。装置90において、放射アパーチャーは、感知ボリュームに共役な像面に位置し、実質的にこの感知ボリュームからだけ光を透過させる。装置90においては、頂部及び底部光学システムにおける放射アパーチャーは関連する励起アパーチャーと同じサイズであるが、他のサイズを使用してもよい。放射偏光子は頂部光学ヘッド112aと共にだけ含まれる。射アパーチャー及び放射偏光子は実質的にその励起相対物に等しい。

【0036】

励起偏光子114及び放射偏光子132は、一定のバックグラウンド信号を排除するために非偏光分析において一緒に使用してもよい。試料ホルダー及び試料ホルダーに付着した発光分子からの発光は偏光していると期待される。なぜなら、これらの分子の回転移動性は妨害されるはずだからである。このような偏光したバックグラウンド信号は、励起偏光子と放射偏光子との“交差”によって、すなわち、90°の伝送軸間の角度のセットによって除去可能である。上述のように、このような偏光したバックグラウンド信号は、感知ボリュームを同じホルダーの壁から離れるように移動することによっても低減可能である。信号レベルを増大するために、ビームスプリッター118は一方の偏光の反射及び他方の偏光の透過にとって最適化すべきである。この方法は、溶液内での小さい発光分子に対しても当てはまるが、対象の発光分子が比較的偏光しない光を発光する場所で最もよく働く。

【0037】

次に、透過光は放射ファイバー光学ケーブル134a、134bを通過して放射光学シャトル（あるいはスイッチ）136に入る。このシャトルは、適当な発光ファイバー光学ケーブルを適当な検出器の前に位置づける。装置90では、これらの構成要素は実質的にそれらの励起相対物と実質的に等しいが、他の機構を用いてもよい。

【0038】

次に、ファイバー光学ケーブルを出る光は、光強度を低減する機構を一般に備

えた一あるいは二以上の“強度フィルター”を通過してもよい。強度は単位時間当たり単位面積当たりの光量である。装置90では、波長に実質的に独立な光を吸収し、吸収した光を熱として散逸する放射中性密度フィルター138によって強度が変えられる。放射中性密度フィルター138は、ほとんどの入射光を吸収する高密度フィルターHと、いくらか少なめに入射光を吸収する中間密度フィルターMと、入射光を実質的に吸収しないブランクOとを含んでもよい。これらのフィルターは手動で変えられるが、フィルターホイールのような他の方法を使用してもよい。強度フィルターは吸収なしで光の一部を試料からそらしてもよい。例としては、光の一部を一方の経路に沿って伝達され、それ以外の光を他の経路に沿って反射するビームスプリッターと、回折を介して光を異なる経路に沿って偏向するポッケルスセルとを含んでいる。

【 0 0 3 9 】

次に、光は、放射フィルターホイール142に收容されてもよい放射干渉フィルター140を通過してもよい。装置90では、これらの構成要素はその励起相対物と実質的に等しいが、他の機構を使用してもよい。放射干渉フィルターは、反射及び散乱を含む様々な機構を介して放射経路に入る迷った励起光をブロックする。ブロックされなければ、このような迷った励起光は検出されてフォトルミネセンスとして誤認される可能性があり、信号－バックグラウンド比を低下する。放射干渉フィルターは、フォトルミネセンスが対応した励起光より長い波長を有するので、励起光からフォトルミネセンスを分離可能である。

【 0 0 4 0 】

スペクトル、強度、偏光及びこの明細書で示した他のフィルターは、本発明の範囲を逸脱することなく変更してもよい。例えば、強度フィルターのような、一光学経路においてここで使用されたフィルターは、他の光学経路で使用してもよい。さらに、変更フィルターのような、ここで頂部あるいは底部光学で使用したフィルターは、他の頂部あるいは底部光学において、あるいは両頂部及び底部光学において使用してもよい。特定の実験に対するフィルターの最適な位置及び組み合わせは、他の要素の中で、分析モード及び組成に依存するだろう。

【 0 0 4 1 】

最後に、吸収及びフォトルミネセンス分析において使用した検出器に入る。装置 90 では、全てのフォトルミネセンスモードから光を検出する一つのフォトルミネセンス検出器 144 がある。好適な検出器は光電子増倍管 (PMT) である。装置 90 は 4 個の検出器に対する検出スロット 145 a - d を含んでいるが、他の数の検出スロットが備えられていてもよい。

【 0 0 4 2 】

さらに一般的には、検出器は検出光からのエネルギーを装置で処理された信号へ変換することが可能な機構を備えている。適当な検出器には、光電子増倍管、光ダイオード、アバランシェ光ダイオード、電荷結合素子 (CCDs)、及び増感 CCDs 等を含む。検出及び分析モードに依存して、このような検出器は、(1) 光子カウントあるいは連続モード、及び (2) イメージングあるいは積算モードにおいて使用してもよい。

【 0 0 4 3 】

図 6 は、図 3 から図 5 の装置についてのハウジング 150 及び他の付属品の部分分解斜視図である。ハウジング 150 は実質的に装置を囲繞し、連続高色温度キセノンアークランプの回りに 2 つの保護層を (光源スロット 103 a - d と共に) 形成する。ハウジング 150 は、光源及び検出器間での自動試料積み込み及び交換を可能にし、さらに、キセノンアークランプからオペレータを守る。

【 0 0 4 4 】

偏光測定方法

装置 90 は、定常状態及び時間分解偏光分析を行うために使用してもよい。定常状態偏光分析は、連続スペクトル光源を使用して一定の照明下での偏光を測定する。時間分解偏光分析は、時間変化光源を使用して、時間の関数として偏光を測定する。

【 0 0 4 5 】

定常状態偏光分析は以下のように行う。連続スペクトル光源からの励起光は、励起フィルター、ファイバー光学ケーブル、及び励起偏光フィルターを介して方向付けられる。次に、励起光は、ほとんどの光を組成物で反射し、わずかの光を光りモニターに透過するビームスプリッターに方向付けられている。組成物から

の放射光はビームスプリッターを介して逆方向に方向付けられ、次に光電子増倍管による検出の前に他の低ルミネッセンスファイバー光学ケーブル、放射フィルター、及び（S方向あるいはP方向のいずれかの）励起フィルターを介して方向付けられる。

【 0 0 4 6 】

2つの測定は各組成物に対して実施される。一方は、一列に配置した励起偏光子及び放射偏光子を使って、他方は、交差した励起偏光子及び放射偏光子を使って実施する。いずれかの偏光子は静的あるいは動的であり、いずれかの偏光子がS方向あるいはP方向にセットされてもよいが、典型的には励起偏光子はS方向にセットされる。

【 0 0 4 7 】

定常状態偏光分析は、連続試料が検査位置を交差する光学経路に自動的にかつ直列に並んだときに、高色温度光を継続的に偏光しかつ透過すること、及び各試料から発せられた偏光光を検出することによって実施されてもよい。

【 0 0 4 8 】

信号のエンハンスメント

希釈した試料から良い信号－ノイズ比及び信号－バックグラウンド比とを得ることは、装置で行われる蛍光偏光及び他の分析において非常に重要である。例えば、結合分析では、ナノモルの10分の1の範囲の解離定数を有する分子を含む結合をプローブできることがしばしば望ましい。これは、ナノモルの10分の1の範囲の蛍光濃度を有する組成物から許容される信号－ノイズ比及び信号－バックグラウンド比とを得ることができることによって容易にされている。以下で議論する信号－ノイズ比及び信号－バックグラウンド比をエンハンスする方法は、装置がこのような希釈試料を使用して要求された感度を得ることができるようにし、試薬コストを最小限にしている。さもないければ、試薬コストはかなりの額になる。

【 0 0 4 9 】

一般的には、装置の構成要素は、装置が行うことが可能な蛍光偏光分析及び他の分析の双方において、感度及びダイナミックレンジをエンハンスするように選択される。この目的に向かって、低固有ルミネッセンスと高固有スループットを

有する光学部材を選択する。さらに、いくつかの構成部材は異なるモードによって共有され、他の構成要素は特定モードにのみ使用される。例えば、フォトルミネセンス強度及び定常状態フォトルミネセンス偏光モードは連続スペクトル光源を共有し；時間分解ルミネセンスモードは時間変化光源を共有し；化学ルミネセンスモードは光源を使用しない。同様に、フォトルミネセンスモードと化学ルミネセンスモードは異なる検出器を用いる。

【 0 0 5 0 】

感度も測定へのノイズの影響を低減することによってエンハンスされる。蛍光偏光分析では、様々なファクターが、(1) バックグラウンドノイズ、及び(2) 強度ノイズを含むノイズに影響する。バックグラウンドノイズは、装置及び試料ホルダーにおける蛍光種を含む対象の蛍光種よりも蛍光種からの信号に寄与するものである。強度ノイズは、光子に起因する揺らぎを含む光強度における揺らぎである。

【 0 0 5 1 】

バックグラウンドノイズは、装置及び試料ホルダーからの自己蛍光を低減することによって低減されてもよい。例えば、装置は融解されたシリカファイバー光学ケーブルのような低ルミネセンス構成要素を使用しても良い。同様に、試料ホルダーは黒ポリスチレンのような低蛍光材料から成ってもよい。

【 0 0 5 2 】

バックグラウンドノイズは、試料ホルダーに付着し固定した試料の構成要素からの蛍光の検出を低減する(さもなければ、高蛍光偏光につながってしまう)ことによって低減してもよい。例えば、試料ホルダーの壁は、結合が低減されるように構成されあるいは処理されてもよい。その代わりに、実質的に感知ボリュームたけから透過された光を検出することが可能な装置では、感知ボリュームは試料ホルダーの壁から離れた、組成物の中心近傍に位置してもよい。

【 0 0 5 3 】

強度ノイズは、光源強度の揺らぎを補正することによって低減してもよい。光源揺らぎは電源からの電力の揺らぎとアークランプにおけるアークの位置のドリフトとに起因する。蛍光量は励起光量に比例するので、光源揺らぎは蛍光揺らぎ

につながる。蛍光揺らぎは蛍光偏光分析において特に重要である。なぜなら、このような分析が連続測定された蛍光信号の大きさを比較することを含んでいる。光源揺らぎは、上述のように、安定な光源を選択すること、及び、光源ミラーから得られた情報を使って蛍光信号を再スケールすることによって低減してもよい。

【 0 0 5 4 】

強度ノイズは、検出される光子数（光量）を増加して、光子ノイズを低減することによって、低減しても良い。光子（あるいはショット）ノイズは光の統計的性質に由来し、放射線減衰を記述するために使用される同じ統計法則によって記述されても良い。特に、 N 個の光子を所定の時間インターバルの間検出すれば、光子ノイズに起因した数に関連した標準偏差は \sqrt{N} になる。光子ノイズの相対的重要性は、検出される光子の増加に従って減少する。なぜなら、信号に対する信号の標準偏差の比が $\sqrt{N}/N = 1/\sqrt{N}$ となる。強度ノイズについて多くの原因があるが、光子ノイズによって決まる制限は決して克服することはできない；しかしながら、光子ノイズの重要性は検出器で収集される光子数を増加することによって低減することができる。収集された光子数は、光源の強度、検出器の効率、及び／又は、ビームスプリッターのような光学中継構造の構成要素のスループットを増大することによって増加してもよい。

【 0 0 5 5 】

光子ノイズは、蛍光偏光分析におけるノイズを生成する。非常に良い近似では、偏光のノイズは、偏光を計算する蛍光強度のノイズに比例し、かつ強度における全1%標準偏差に対して偏光における7mP標準偏差に対応する。この関係は、実質的に偏光の程度には依存しない。光子のノイズのため、光学的に限定されたマイクロプレート形式における迅速な高スループット遮断（high-throughput screening）測定に対する要求が、十分な光を簡単に収集することを重んじる。さらなる情報については、ここに参考文献によって組み込まれているU.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/063,811における計算を見られたい。

【 0 0 5 6 】

十分に発展された偏光装置は、100mPと200mPとの間の最大偏光変化を有する。

そのため、偏光における許容標準偏差は約5mPから10mPより大きくないはずである。これは、強度ノイズを約1%に低減するには、1強度測定当たり少なくとも10,000個の光子を検出することを要求するものである。偏光光学システムの非効率性は問題を大きくする。収集された光子数は濃度と検出時間の両方に比例し、プローブ濃度と遮断スループット (screening throughput) との間の取り決め (trade off) につながる。試薬の高濃度は高価であるばかりでなく、濃度が結合反応の解離定数を超えるならば、強度結合分析を生ずる。

【 0 0 5 7 】

図7及び図8は、本発明に対応して構成された蛍光偏光装置を特徴付ける結果を示している。データは、図3から図6で示した好適な装置を使用して、室温で収集した。

【 0 0 5 8 】

図7は、96井戸マイクロプレート及び384井戸マイクロプレートでのフルオレセインの階段希釈における偏光を示すグラフである。グラフは、フルオレセインの偏光が100pMまでのあるいはそれ以下の適当な確度及び精度によって測定される。なぜなら、測定値はこの濃度まであるいはそれ以下の濃度に対して実質的に独立だからである。

【 0 0 5 9 】

図8は、384井戸マイクロプレートでのフルオレセインの階段希釈における偏光におけるノイズ (標準偏差) を示すグラフである。5-10mP以下のノイズは上述のように非常に実用的なFP分析に対して十分に小さい。迅速に走査した384井戸マイクロプレートにおけるナノモルの10分の1レベルの濃度でよい精度が得られる。もっと遅く走査されたマイクロプレートにおいてはより高い精度が得られる。エラーバーサイズは、pH7.5での100ピコモルフフルオレセイン溶液から100ミリ秒で検出器で収集される光子数は10,000個を超えることを示している。

【 0 0 6 0 】

好適な光源の説明

上述のように、光子ノイズ問題は、連続高色温度キセノンアークランプあるいはレーザーのような十分に高強度の光源を使って除去しても良い。以下の表は、

図3-6で開示した装置で使用された好適な連続時間変動光源を比較したものである。

【表1】

	連続スペクトル光源	フラッシュランプ光源	比較 (フラッシュ/連続)
光源寿命	300 hrs	10,000 hrs	6 %
光源の全強度	13,000 mW	830 mW	5 %
可視強度 (390-770 nm)	5,100 mW	230 mW	3 %
赤外線強度 (>770 nm)	7,300 mW	190 mW	11 %
紫外線 (300-390 nm)	620 mW	68 mW	4 %
装置強度 (485 nm)	1.1 mW	0.29 mW	4 %
	1.7×10^{18} 光子/秒	7.1×10^{16} 光子/秒	
1 nM からの光子/秒 蛍光体溶液 (見積値)	1×10^8 光子/秒	5×10^4 光子/秒	5 %
10 pM からの光子/秒 蛍光体溶液 (見積値)	1×10^6 光子/秒	5×10^4 光子/秒	5 %

【0061】

連続スペクトル光源はフラッシュランプの1/33の寿命しかない。連続スペクトル光源の寿命は製造仕様から直接得られた。フラッシュランプの寿命は以下のような製造仕様を用いて計算した。フラッシュランプは1パルス当たり250ミリジュールの電力を用いて、1秒当たり100フラッシュで作動した。フラッシュランプの寿命はこの電力レベルで $1 \times 10^8 - 1 \times 10^{10}$ フラッシュで評価された。これは、約10,000時間 ($5 \times 10^8 / (100 \text{ Hz} \times 3600 \text{ 秒/時間})$) の寿命に翻訳されるものである。

【0062】

連続スペクトル光源はフラッシュランプに比べて約20倍の光を供給する。(F/1.0の光学システムで収集した) 連続スペクトル光源の全光パワーは300-4000nmの範囲にわたって13Wである。(F/1.0の光学システムで収集した) フラッシュランプの全光パワーは100-4000nmの範囲にわたって830mWである。全フラッシュランプパワーは、電気エネルギー、電気-光変換効率、光学収集効率、及び繰り返し

返し率 ($250\text{mJ} \times 50\% \times 6.6\% \times 100\text{Hz}$) から導出した。フラッシュランプの異なるスペクトルの光パワーは、各波長域において全フラッシュランプパワーにパワー率、すなわち、可視 ($390\text{-}770\text{ nm}$) 28%、赤外線 (770+ nm) 24%、紫外線 ($300\text{-}390\text{ nm}$) を乗じることによって導出した。

【 0 0 6 3 】

好適な装置における光パワーはバンドパスフィルター (中心 485nm 、幅 20nm) を通過させてから決めた。1秒当たりの光子における光パワーは、全光子が 485nm の波長 (エネルギー $=1240\text{eV} \times \text{nm}/\text{波長}$) を有することを仮定することによって計算した。

【 0 0 6 4 】

高スループット遮断では光が迅速にかつ有効に収集されることを要求し、そのため、分析は精密にかつ迅速に行われる。偏光における7mPエラーに対応して、強度測定で1%エラーを得ることは、上述のように少なくとも10,000光子の収集が必要となる。高スループット遮断では、これらの光子が、100,000光子/秒の収集率に対応して、100ms以内で収集されるはずである。

【 0 0 6 5 】

両ランプとも100,000光子/秒以上を生成するが、基準は100,000蛍光光子/秒を収集することであって、その数の励起光子を生成することではない。特に、基準は蛍光体の低濃度 (1 nM以下) に対して100ms (1×10^5 光子/秒) において少なくとも10,000光子をカウントすることである。好適な装置はFP測定に対しておおよそ10-100pMでこの光子限界を得る。試料ホルダーは約5mmの光学距離を提供する。典型的なモル励起係数は1cm当たり1モル当たり50,000である。ランベルト・ベアの法則 ($\log(I_0/I) = \epsilon c l$) をもとに、1nM溶液に対して吸収される光子率は約 6×10^{-5} (10pMに対して約 6×10^{-7}) である。典型的な蛍光体の量子効率 (吸収された光子に対する放射された光子の比) は0.9であり、そのため、(1nMで) 入射光子の約 5×10^{-5} 個は蛍光放射光子に変換される。これは有効な放射効率である。

【 0 0 6 6 】

装置の収集効率も重要である。蛍光は全方位に放射され、蛍光は限定的な角度

にわたって収集する。蛍光が収集されるテーパ角は以下の式で与えられる： $\theta = \arcsin[(NA/n)]$ 。ここで、NAは開口数で、nは屈折率である。光収集効率はNAが0.39の場合には3%であり、また、NAが0.22の場合には1%である。光も検出器を透過しなければならない。好適な装置の透過効率はおそらく2%程度である。さらに、検出器は検出量子効率を有し、好適な装置で使用されるようなPMTに対して典型的には20-25%である。これら全段階を通過した後にえられるネットの結果が検出効率であり、以下のような放射効率 (emission efficiency)、収集効率 (collection efficiency)、透過効率 (transmission efficiency)、及び量子効率の積によって与えられる：

【表2】

濃度	検出効率 (見積値)
1 nM	$5 \times 10^5 \times 0.03 \times 0.02 \times 0.25 = 8 \times 10^9$
10 pM	$5 \times 10^7 \times 0.03 \times 0.02 \times 0.25 = 8 \times 10^{11}$

【0067】

検出効率は、1nM及び1pMで見積もり測定可能束（光子/秒）に対して励起束を乗じた。フラッシュランプは十分な光パワーを有しており、1nMで統計的に重要な測定を行うが、10pMでは行わない。このとき、光パワーは 1×10^5 光子/秒以下である。

【0068】

検出効率を考慮すると、連続スペクトル光源は収集基準を満たすが、フラッシュランプは満たさない。特に、連続スペクトル光源は典型的な蛍光体に対して1秒当たり100,000個の光子の基準が10pM以下に落ち、一方、フラッシュランプは基準が200pMあたりに落ちる（約20倍高い）。

【0069】

連続スペクトル光源は3,90nmから770nmの可視波長域にわたって1ワット以上のパワーを有し、かつ、光子ノイズをpH7.5で100ピコモルのフルオレセイン溶液から放射された光信号をの1%以下に低減するのに十分である。

【 0 0 7 0 】

偏光実験の説明

図9から図12は、本発明の生物学的問題への応用を示している。データは、図3から図7で示した好適な装置を使って室温で収集した。図9から図12は、(1) 結合平衡を測定すること、(2) 酵素活性 (enzyme activity) を測定すること、(3) 酵素活性の阻害剤 (inhibitor) を遮断することを含む蛍光偏光分析のいくつかの応用を示している。

【 0 0 7 1 】

図9は、結合平衡を測定するために使用中の蛍光偏光を示している。特に、蛍光偏光は牛乳からのタンパク質、 α カゼイン (MW 25,000ダルトン) の凝集をモニターするのに用いた。カゼインはRu(bpy)₃dcbpy(ルテニウム 2,2'-ジビピリジル4,4'-ジカルボキシル-2,2'-ビピリジン)のNHSエステルによってラベルされている；自由Ru(bpy)₃dcbpyは、約370ナノ秒の蛍光寿命 (τ_f)、約300mPの固有偏光 (P_0)、フルオレセインの約1%の結合された励起係数及び量子収率を有する。タンパク質はmgのタンパク質あたり25 μ gのRu(bpy)₃dcbpyの比でレベルされており、ラベルされたタンパク質は50mMのTRISにおいて100 μ g/mLの終濃度に希釈した。カゼインは大きく負にイオン化しておりして、多くのリン酸化群を有する。カゼインも酸性であり、等電のpH4からpH4.5を有する。カルシウムがないときは、カゼインが個々のタンパク質間のイオンブリッジによって凝集する。図9で示したように、モノマータンパク質は低い測定可能な約48mPの偏光を有し、凝集したタンパク質は約200mPの高偏光を有する。

【 0 0 7 2 】

さらに一般的に、結合平衡の蛍光偏光分析は、レセプターと潜在的阻害剤とを有するシステムにおいてラベル化した配位子を配置することによって、配位子/レセプターの阻害剤を遮断するために用いても良い。阻害剤はレセプターに結合したラベル化した配位子を開放し、偏光する。なぜなら、結合した配位子が高い分子量を有しそのため高偏光を有し、一方、自由配位子は低い分子量と低偏光とを有するからである。結合した分子と自由分子との混合物の偏光は個々の種の偏光に関係しているので、結合量は結合分子と自由分子の分離を行うことなく、標

準曲線から決めることができる。この技術は細胞の凝集を研究するのに用いてもよい。

【 0 0 7 3 】

図10は、酵素活性を検出するための使用中の蛍光偏光を示している。特に、蛍光偏光は、鍵穴カザガイ (keyhole-limpet) のヘモシアニン上の牛の腓臓のプロテアーゼの混合物の動作をモニターするために用いた。ヘモシアニンは、1mgあたり100 μ gのRu(bpy)₃ dcbpyの比で上記のようにラベル化した。ラベル化したタンパク質は50mMTRISにおいて22 μ g/mLの終濃度に希釈した。牛の粗プロテアーゼ (bovine crude protease) を希釈化したラベル化タンパク質を添加して、5 μ g/mLの終濃度にした。図10で示したように、プロテアーゼがラベル化タンパク質を分解してより小さく速く回転する断片を形成したので、偏光は約220mPから約30mPまで落ちた。

【 0 0 7 4 】

さらに一般的には、蛍光偏光は酵素活性自体及び酵素活性の阻害剤を遮断するのに用いてもよい。適当な酵素はプロテアーゼとヌクレアーゼとを含む。プロテアーゼは炎症性疾患、感染症、及び細胞自滅 (アポプトosis) を理解し、処理する際に重要なので、特に興味深い。

【 0 0 7 5 】

図11と図12は、酵素の変調器 (通常阻害剤) を遮断するため、均一な免疫測定形式での使用中の蛍光偏光を示している。特に、蛍光偏光はチロシンキナーゼ活性をモニターするのに用いた。抗リン酸チロシン抗体 (腹水液の1:750希釈) とフルオレセインでラベル化したリン酸チラミン (1nM) とをリン酸チロシンキナーゼ基板 (すなわち、酵素生成物) の指示濃度を使ってインキュベートした。酵素生成物は競争的に抗体からラベル化した化合物を開放し、蛍光を低減した。なぜなら、ラベルの蛍光は抗体に結合したときには高く、酵素生成物によって抗体から離されたときには低いからである。酵素活性が高いほど、蛍光偏光が低くなる。

【 0 0 7 6 】

図11と図12は、様々な分析条件のもとで得られた結果を示している。図1

1 は、96井戸マイクロプレートにおける200 μ L試料に対する結果と、1536井戸マイクロプレートにおける5 μ L試料に対する結果とを示している。平均4mPから8mPのエラーバーが標準偏差である。データから決定された磷酸チロシンIC₅₀値は200 μ L試料に対しては379 \pm 22nMであり、5 μ L試料に対しては326 \pm 30nMである。エラーバーは平均の標準エラーである。図12は、384井戸マイクロプレートにおける40 μ L、60 μ L、80 μ L及び100 μ Lの試料に対する結果を示している。平均1mPから4mPのエラーバーは標準偏差である。図11及び図12における偏光に対するエラーバーは、分析に対する偏光の最大変化、約110mPと比較すべきである。

【0077】

本発明を好適な形で開示したが、ここで開示し示した特定の実施形態は限定的な意味で取り上げたのではなく、多くの変形が可能である。例えば、本発明を主に蛍光偏光分析によって説明したが、本発明はリン光偏光分析もカバーしている。というのも、リン光偏光分析も同様な原理、すなわち、一重項状態よりも三重項状態に起因した励起状態崩壊によって行うからである。出願人は、本発明の主題が、全ての新奇でかつ明らかな組み合わせとここで開示した特徴様々な構成要素、特徴、機能、及び／又は特性の従属項とを含んでいると考えている。開示した実施形態の単一の特徴、機能、構成要素は本質的ではない。クレームは新奇でかつ明らかなではないと考えられる特徴、機能、構成要素、及び／又は特性の組み合わせと従属項とを定義している。他の組み合わせと従属項とは、この出願あるいは関連出願における現クレームの補正あるいは新たなクレームの提示を介してクレームされてもよい。オリジナルのクレームの範囲においてより広く、より狭く、あるいは等しいクレームも、出願人の発明の主題内に含まれていると考えられる。

【0078】

本発明に関連したクロスリファレンス

本願は、この明細書中に参考文献として組み込まれた以下の特許出願の続きである：米国特許出願第09/062,472号（出願日1998年4月17日）、米国特許出願第09/156,318号（出願日1998年9月18日）、米国特許出願第09/160,533号（出願日1998年9月24日）。

本願は、この明細書中に参考文献として組み込まれた以下の米国仮特許出願の米国特許法第119条によるクレームの利益に基づいたものである：米国特許出願第60/063,811号（出願日1997年10月31日）、米国特許出願第60/072,499号（出願日1998年1月26日）、米国特許出願第60/072,780号（出願日1998年1月27日）、米国特許出願第60/075,414号（出願日1998年2月20日）、米国特許出願第60/075,806号（出願日1998年2月24日）、米国特許出願第60/082,253号（出願日1998年4月17日）、米国特許出願第60/084,167号（出願日1998年5月4日）、米国特許出願第60/085,335号（出願日1998年5月13日）、米国特許出願第60/085,500号（出願日1998年5月14日）、米国特許出願第60/089,848号（出願日1998年6月19日）、米国特許出願第60/092,203号（出願日1998年7月27日）、米国特許出願第60/094,275号（出願日1998年7月27日）、米国特許出願第60/094,276号（出願日1998年7月27日）、米国特許出願第60/100,817号（出願日1998年9月18日）、米国特許出願第60/100,951号（出願日1998年9月18日）、米国特許出願第60/104,964号（出願日1998年10月20日）。

【図面の簡単な説明】

【図1】 分子の再配向がどのように蛍光偏光に影響を与えるかを説明するための蛍光ラベルされた分子の概略図である。

【図2】 本発明に従って蛍光偏光を測定する装置の概略図である。

【図3】 本発明に従って蛍光偏光を測定する他の装置の概略図である。

【図4】 図3で示した装置の概略部分斜視図である。

【図5】 図3で示した装置の光学要素の概略図である。

【図6】 図3で示した装置用のハウジングの概略部分分解図である。

【図7】 装置の感度を示すグラフであって、96井戸マイクロプレート及び384井戸マイクロプレートにおける偏光とフルオレセイン濃度との関係を示すグラフである。

【図8】 装置の感度を示すグラフであって、全マイクロプレートの4分読み取り時間及び9分読み取り時間後に決定した、384井戸マイクロプレートにおける偏光の標準偏差とフルオレセイン濃度との関係を示すグラフである。

【図9】 蛍光偏光が酵素活性をどのように測定するかを示すグラフであっ

て、偏光と α カゼイン凝集との関係を示すグラフである。

【図10】 蛍光偏光が酵素活性をどのように測定するか示すグラフであって、牛の膀胱のプロテアーゼを使った場合と使わなかった場合の鍵穴カザガイヘモシアニン溶液における偏光と時間との関係を示すグラフである。

【図11】 酵素活性の阻害剤を測定するために蛍光偏光を均一な免疫測定形式でどのように使用するか示すグラフであって、96井戸マイクロプレート及び1536井戸マイクロプレートにおける偏光と燐酸チロシン競合体濃度との関係を示すグラフである。

【図12】 酵素活性の阻害剤を測定するために蛍光偏光を均一な免疫測定形式でどのように使用するか示すグラフであって、40 μ L、60 μ L、80 μ L及び100 μ Lの試料に対して決定した384井戸マイクロプレートにおける偏光と燐酸チロシン競合濃度との関係を示すグラフである。

【符号の説明】

30, 120 組成物

52 光源

54, 114 励起偏光子

56, 132 放射偏光子

58 検出器

60 励起光

62 試料

64 蛍光放射光

100 連続スペクトル光源

102 時間変調光源

104 励起干渉フィルター

114 励起偏光フィルター

123 ステージ

126 マイクロプレート井戸

140 放射干渉フィルター

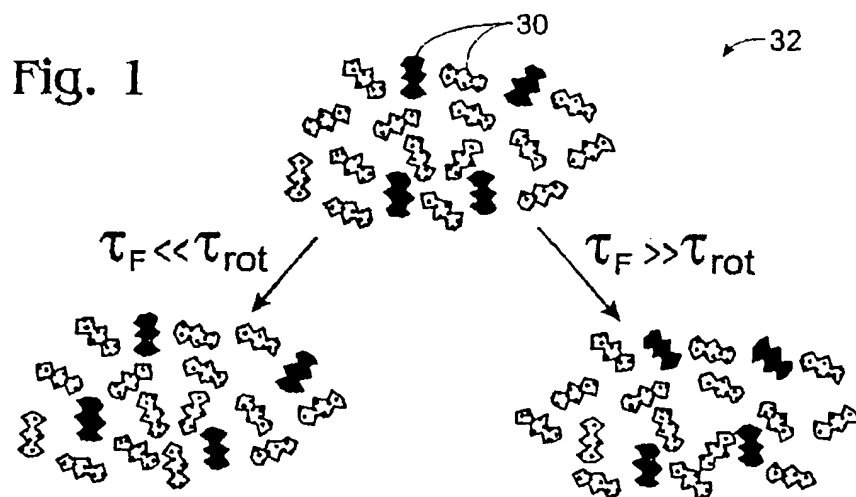
144 フォトルミネセンス検出器

145 a - d 検出器

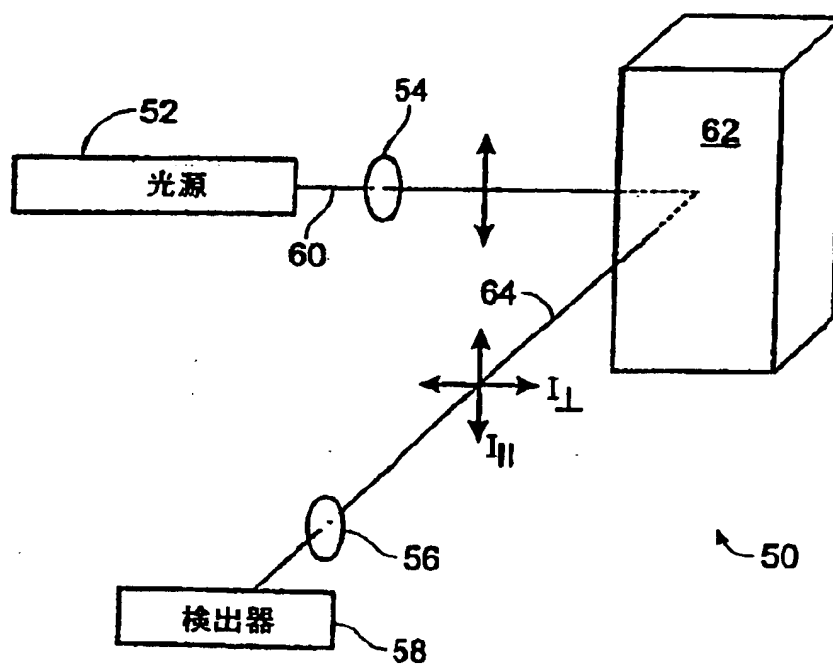
150 ハウジング

160 化学ルミネセンス検出器

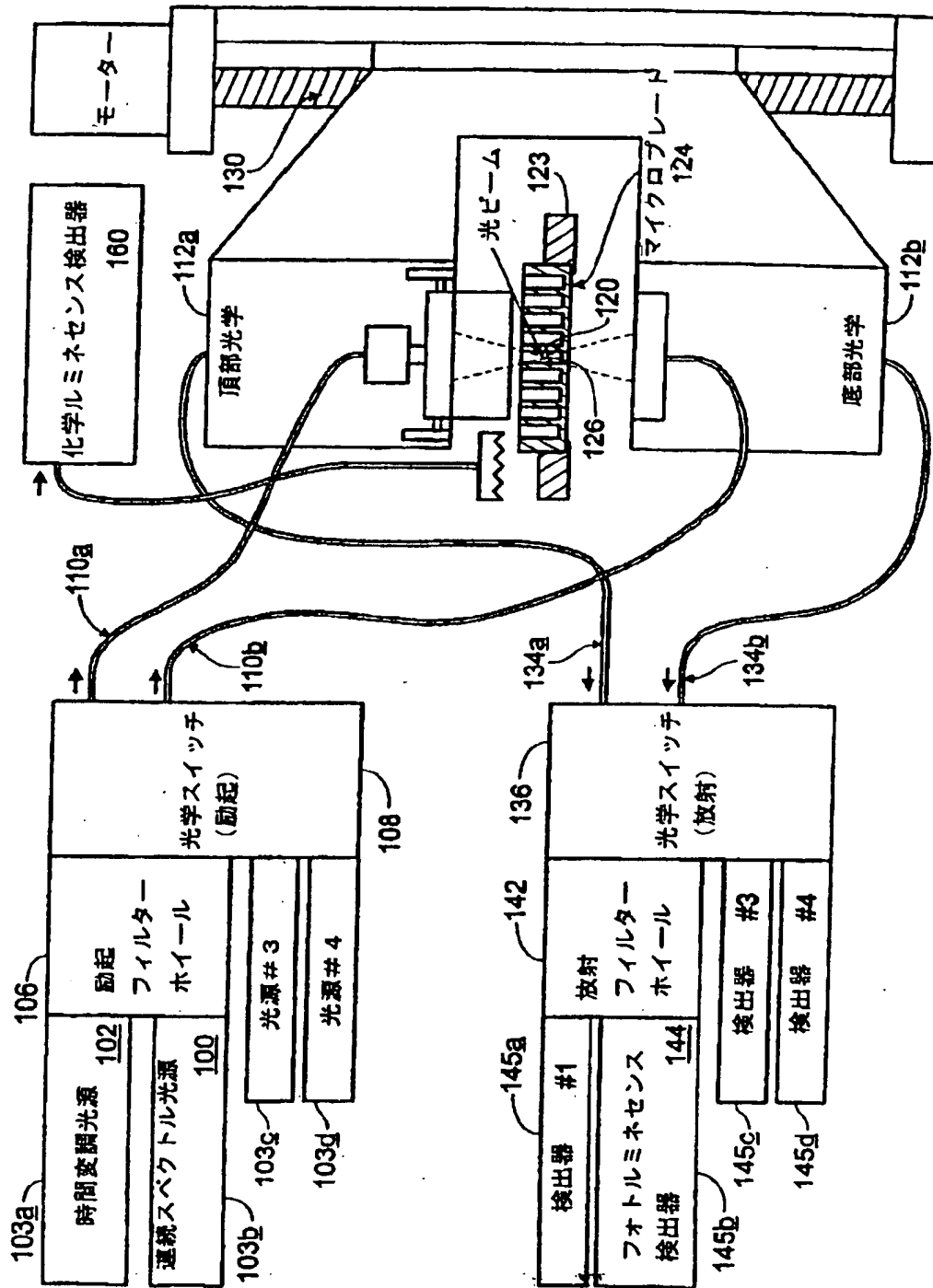
【 図 1 】



【 図 2 】

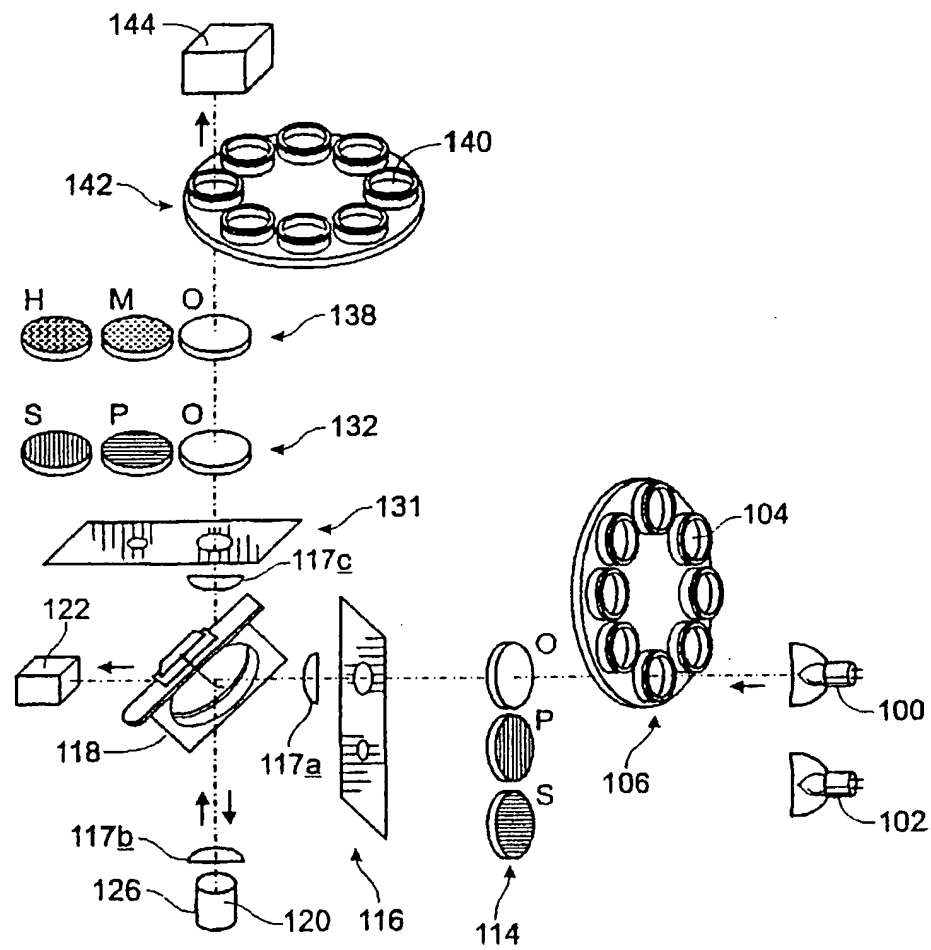


【 図 3 】



【 図 5 】

Fig. 5



【 図 6 】

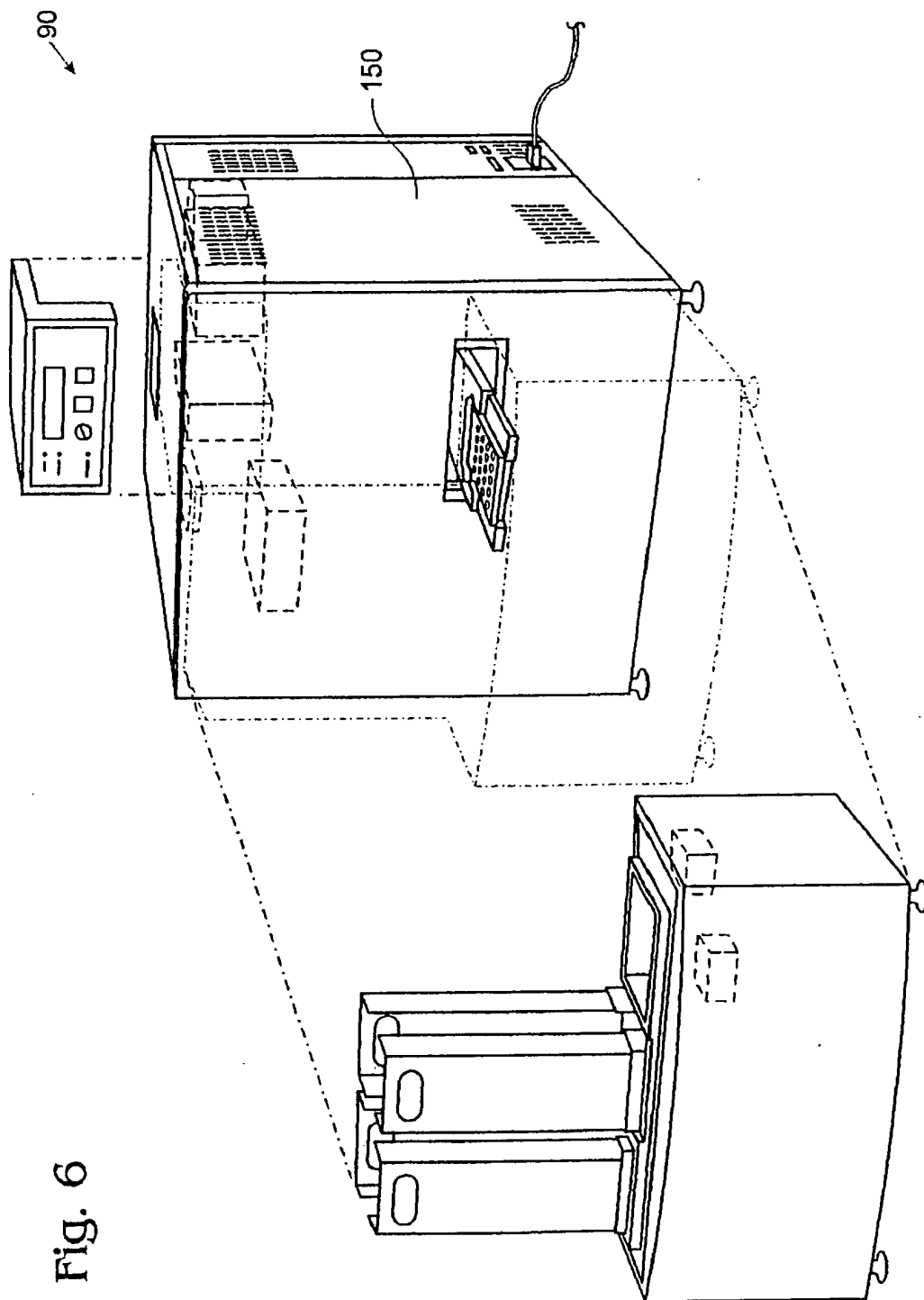
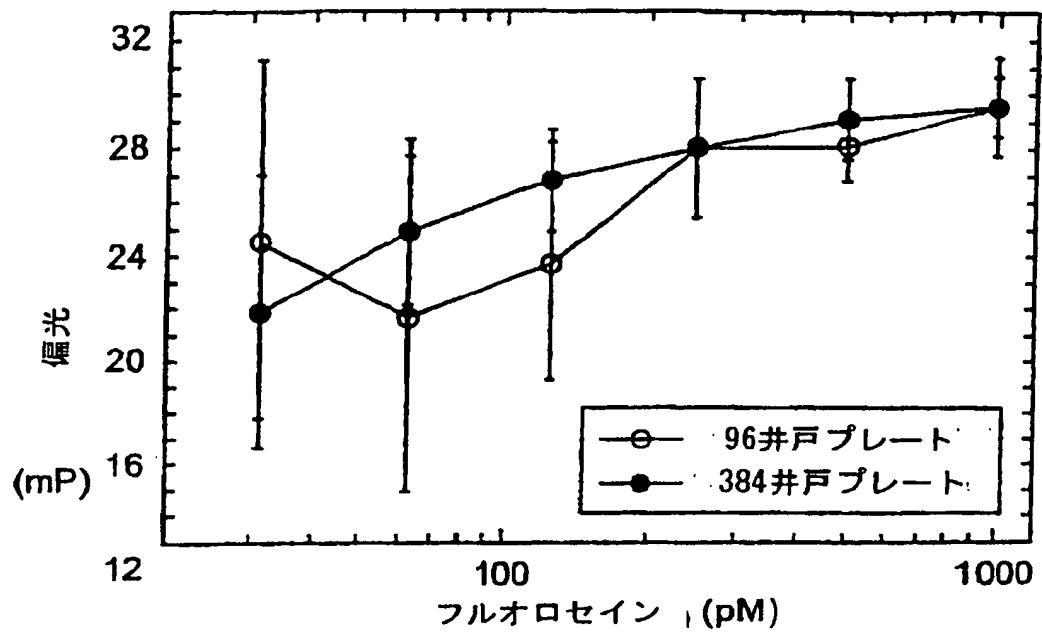
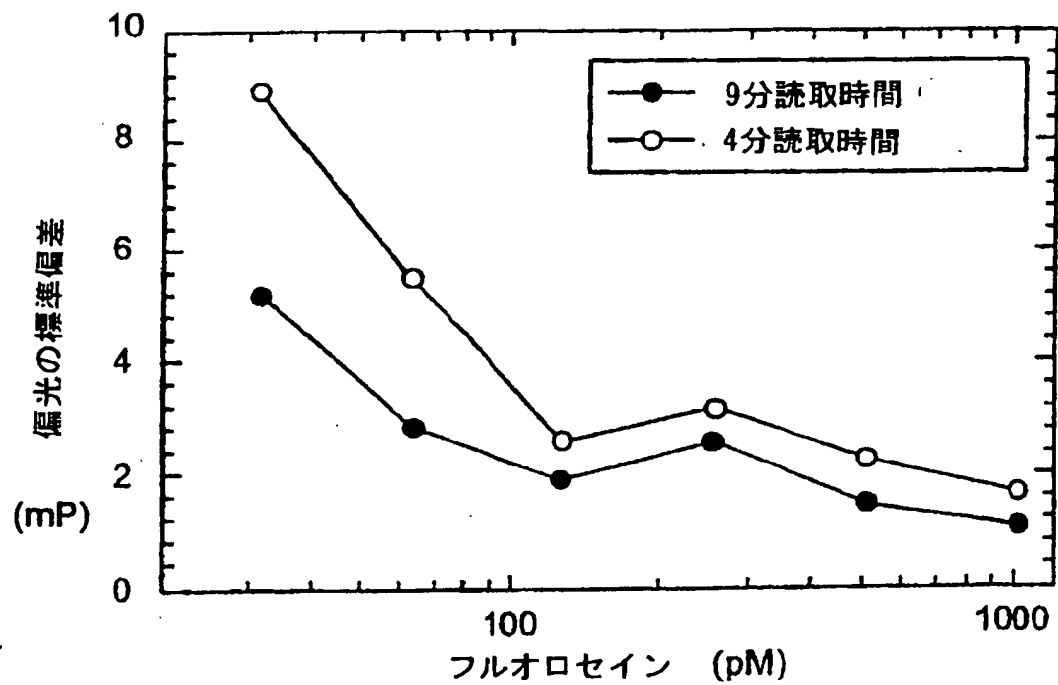


Fig. 6

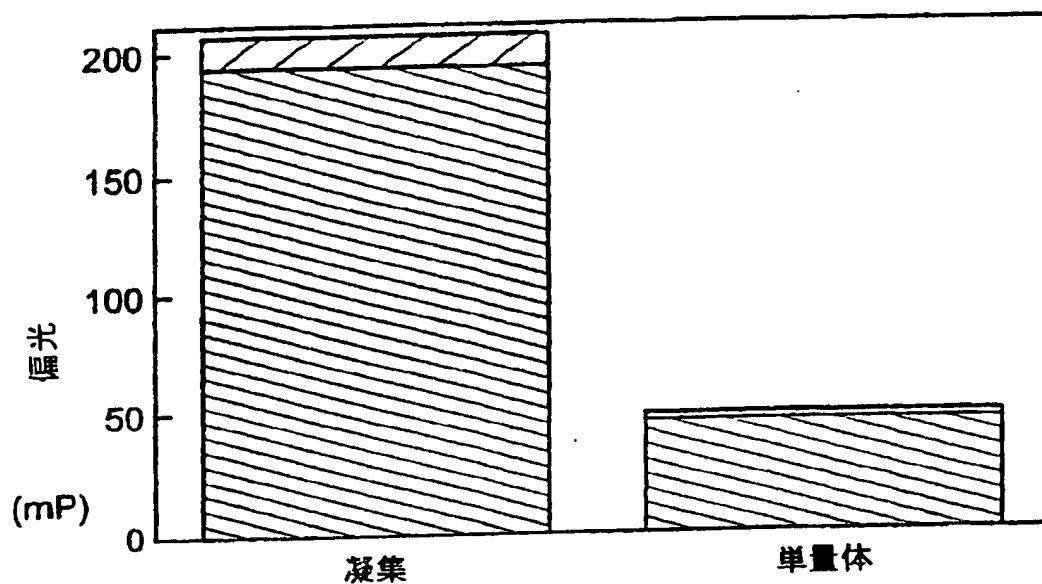
【 図 7 】



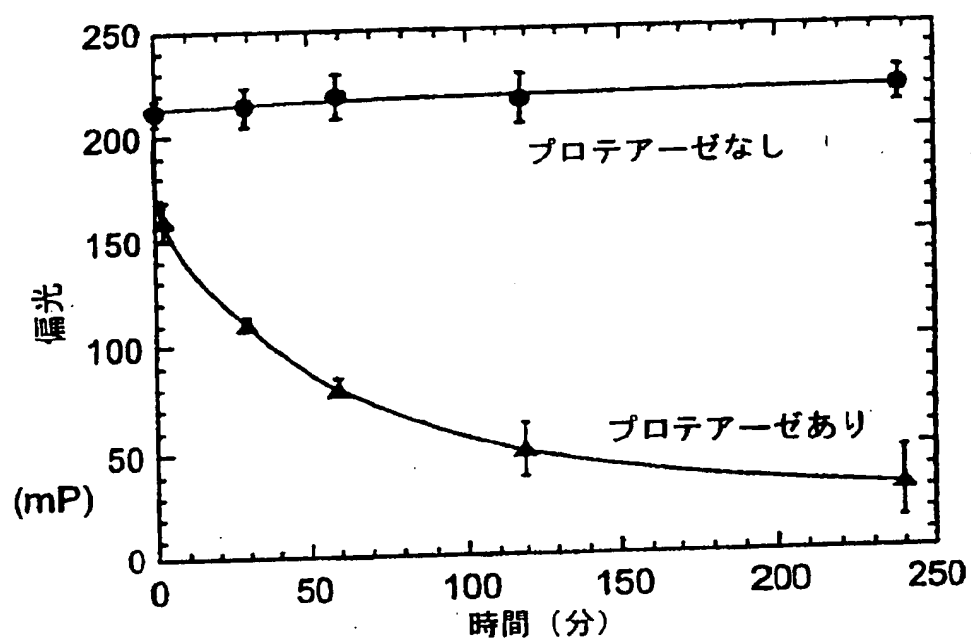
【 図 8 】



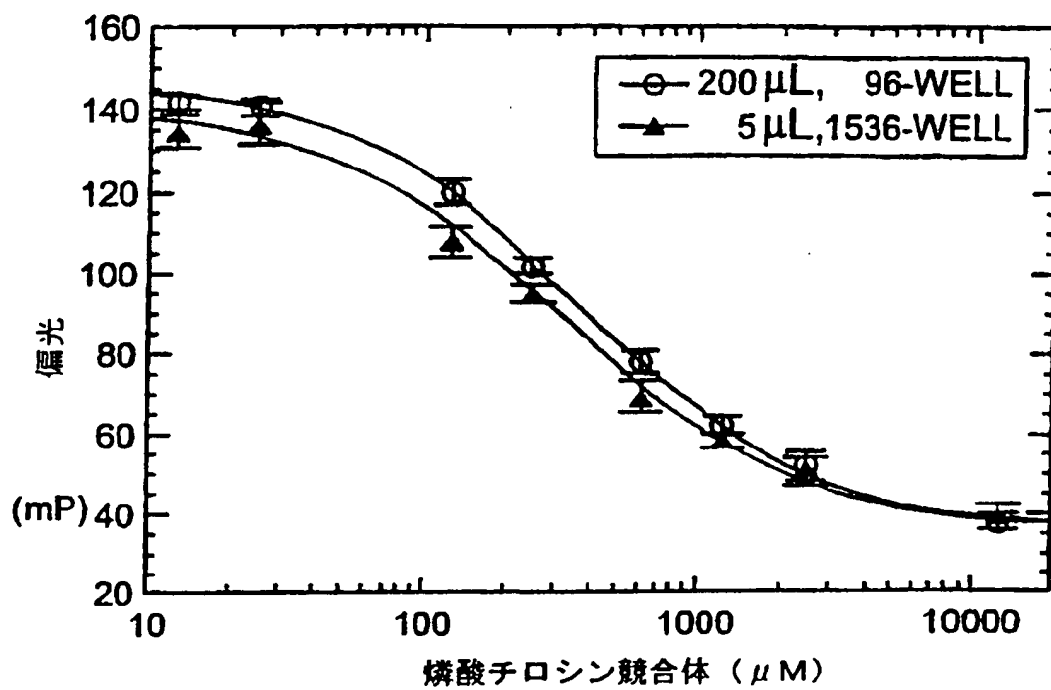
【 図 9 】



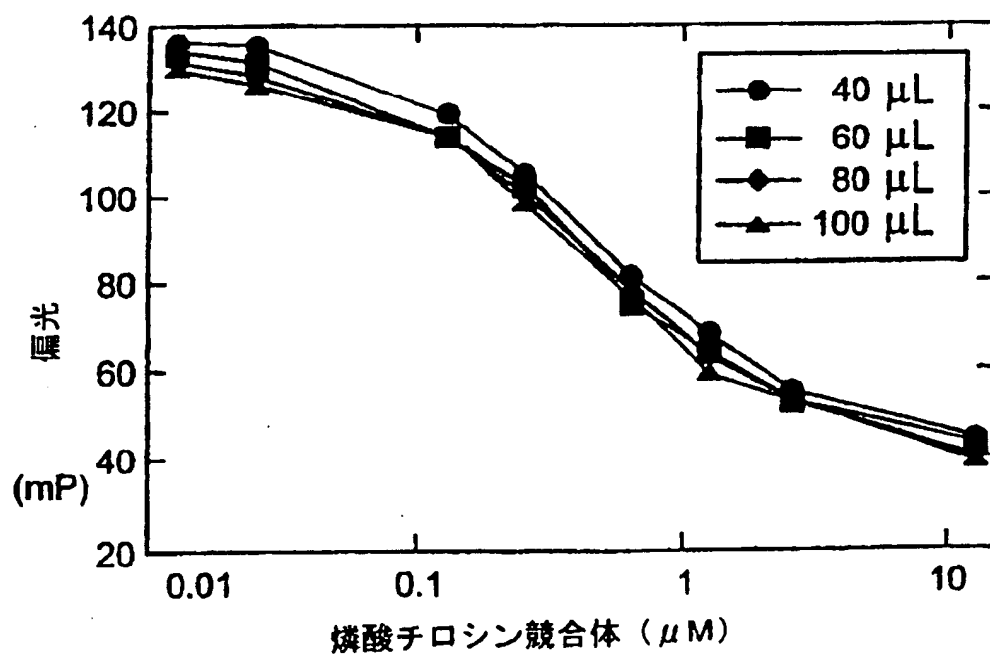
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/23095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : G01N 21/64, 21/21 US CL : 356/317, 367; 250/458.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 356/317, 318, 364, 365, 366, 367, 417; 250/458.1, 458.2, 461.1, 461.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,699,512 A (KOSHI) 13 October 1987 (13/10/87), see entire document, especially col. 2, line 31-46.	1, 16, 17, 21, 31, 32, 38
A	US 4,451,149 A (NOELLER) 29 May 1984 (29/05/84), see entire document	1, 16, 17, 21, 31, 32, 38
A	US 4,203,670 A (BROMBERG) 20 May 1980 (20/05/80), see entire document.	1, 16, 17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 APRIL 1999		Date of mailing of the international search report 17 JUN 1999
Name and mailing address of the ISA US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer ALAYLA LAUCHMAN <i>[Signature]</i> Telephone No. (703) 308-0956

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/072, 780
(32)優先日 平成10年1月27日(1998. 1. 27)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/075, 414
(32)優先日 平成10年2月20日(1998. 2. 20)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/075, 806
(32)優先日 平成10年2月24日(1998. 2. 24)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 09/062, 472
(32)優先日 平成10年4月17日(1998. 4. 17)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/082, 253
(32)優先日 平成10年4月17日(1998. 4. 17)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/084, 167
(32)優先日 平成10年5月4日(1998. 5. 4)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/085, 335
(32)優先日 平成10年5月13日(1998. 5. 13)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/085, 500
(32)優先日 平成10年5月14日(1998. 5. 14)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/089, 848
(32)優先日 平成10年6月19日(1998. 6. 19)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/092, 203
(32)優先日 平成10年7月9日(1998. 7. 9)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/094, 275
(32)優先日 平成10年7月27日(1998. 7. 27)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/094, 276
(32)優先日 平成10年7月27日(1998. 7. 27)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 09/156, 318
(32)優先日 平成10年9月18日(1998. 9. 18)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/100, 951
(32)優先日 平成10年9月18日(1998. 9. 18)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/100, 817
(32)優先日 平成10年9月18日(1998. 9. 18)
(33)優先権主張国 米国(US)

- (31)優先権主張番号 09/160,533
 (32)優先日 平成10年9月24日(1998. 9. 24)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/104,964
 (32)優先日 平成10年10月20日(1998. 10. 20)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW
 (72)発明者 ジョン・シー・オウィッキ
 アメリカ合衆国・カリフォルニア・
 94303・パロ・アルト・ノース・カリフォルニア・アベニュー・956

Fターム(参考) 2G020 AA03 AA04 AA05 BA02 BA14
 BA17 BA20 CA01 CA14 CA15
 CB07 CB23 CB32 CB36 CB42
 CB43 CB51 CC02 CC13 CC26
 CC27 CC28 CC29 CC31 CC42
 CC47 CC55 CD04 CD12 CD13
 CD15 CD23 CD24 CD32 CD33
 CD38 CD53
 2G043 AA06 BA16 CA03 DA02 DA06
 EA01 EA15 FA02 FA03 GA07
 GB19 HA01 HA05 HA06 HA07
 HA09 JA02 JA03 JA04 JA05
 KA01 KA02 KA03 KA05 KA07
 KA08 KA09 LA02 LA03 MA01
 MA04 NA13
 2G059 AA03 BB04 BB12 CC16 DD12
 EE05 EE07 EE12 FF03 FF04
 GG01 GG02 GG04 GG08 HH01
 HH02 HH03 JJ02 JJ03 JJ05
 JJ06 JJ07 JJ17 JJ18 JJ19
 JJ22 JJ25 KK02 KK03 KK04
 MM14 NN01

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.